

07.07.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 25 AUG 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

JP00/4535

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 7月 7日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第192684号

出 願 人

Applicant (s):

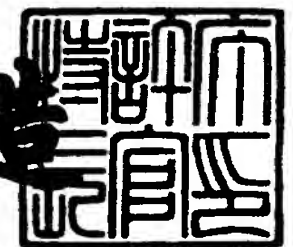
協和醗酵工業株式会社

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3062502

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-0716K5

【提出日】 平成11年 7月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 17/06

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醗酵工業株式会  
社 食品酒類研究所内

【氏名】 斉藤 知明

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醗酵工業株式会  
社 食品酒類研究所内

【氏名】 舩田 幸子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醗酵工業株式会  
社 食品酒類研究所内

【氏名】 屋代 敦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 石黒 博樹

---

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 水酸化脂肪酸および $\delta$ -ラクトン類の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】  $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$ 位が二重結合である脂肪酸の、 $[n-5]$ 位にヒドロキシを $[n-6]$ 位に水素を導入し $[n-6]$ 位を単結合とする活性を有する微生物(以下、第一の微生物という)の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$ 位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含有する組成物に作用させ、 $[n-6]$ 位が単結合の $[n-5]$ -ヒドロキシ脂肪酸を生成させ、生成した $[n-6]$ 位が単結合の $[n-5]$ -ヒドロキシ脂肪酸を採取することを特徴とする $[n-6]$ 位が単結合の $[n-5]$ -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法。

【請求項2】  $[n-6]$ 位の二重結合がシス体である請求項1記載の方法。

【請求項3】 脂肪酸がリノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸および $\gamma$ -リノレン酸であり、生成物がそれぞれ13-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸(13-hydroxy-9-octadecenoic acid)、13-ヒドロキシ-9, 15-オクタデカジエン酸(13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid)および13-ヒドロキシ-6, 9-オクタデカジエン酸(13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid)である請求項1記載の方法。

【請求項4】 第一の微生物が、乳酸菌またはビフィズス菌に属する微生物である請求項1~3記載の方法。

【請求項5】 第一の微生物が、ペディオコッカス属またはビフィドバクテリウム属に属する微生物である請求項1~3記載の方法。

【請求項6】 第一の微生物が、ペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus) IFO 3891、ペディオコッカス・エスピー (Pediococcus sp.) IFO 3778またはビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) JBF A-234-4である請求項1~3記載の方法。

【請求項 7】 第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含む組成物に作用させ  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸生成させ、次いで、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を  $\beta$  酸化する活性を有する微生物 (以下、第二の微生物という) の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、生成する  $\delta$ -ラクトン類を採取することを特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類の製造方法。

【請求項 8】  $[n-6]$  位の二重結合がシス体である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 脂肪酸がリノール酸または  $\alpha$ -リノレン酸であり生成するラクトン類がそれぞれ  $\delta$ -デカラクトンまたはジャスミンラクトンである請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】 第一の微生物が、乳酸菌またはビフィズス菌である請求項 7~9 いずれかに記載の方法。

【請求項 11】 第一の微生物が、ペディオコッカス属またはビフィドバクテリウム属に属する微生物である請求項 7~9 いずれかに記載の方法。

【請求項 12】 第一の微生物が、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) I F O 3 8 9 1、ペディオコッカス・エスピー (*Pediococcus* sp.) I F O 3 7 7 8 またはビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) J B F A-234-4 である請求項 7~9 いずれかに記載の方法。

【請求項 13】 第二の微生物が酵母類である請求項 7~12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】 第二の微生物が、クリベロマイセス属、ザイゴサッカロマイセス属、パフィア属よりなる群から選択される請求項 7~12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】 第二の微生物が、クリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*) I F O 1 0 9 0、クリベロマイセス・マキ

シアンス (Kluyveromyces marxianus var. lactis) IFO0433、クリベロマイセス・マキシアンス (Kluyveromyces marxianus var. marxianus) ATCC 8608、クリベロマイセス・マキシアンス (Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus) ATCC 16045、ザイゴサッカロマイセス・ルキシー (Zygosaccharomyces rouxii) NFR2007、ザイゴサッカロマイセス・バイリー (Zygosaccharomyces bailii)、パフィア・ジャジニー (Pichia jadinii) IFO0987よりなる群から選択される請求項7～12のいずれかに記載の方法。

【請求項16】  $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物に、第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、該組成物中に  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を形成させ、次いで第二の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させることを特徴とする  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を製造する方法。

【請求項17】 組成物が、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する天然油脂を加水分解して得られる組成物である請求項16記載の製造方法。

【請求項18】 組成物が、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する食品である請求項16記載の製造方法。

【請求項19】  $[n-6]$  位の二重結合がシス体である請求項16～18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】 脂肪酸がリノール酸または $\alpha$ -リノレン酸であり生成するラクトン類がそれぞれ $\delta$ -デカラクトンまたはジャスミンラクトンである請求項16～18のいずれかに記載の方法。

【請求項21】 第一の微生物が、乳酸菌またはビフィズス菌である請求項16～20いずれかに記載の方法。

【請求項22】 第一の微生物が、ペディオコッカス属またはビフィドバクテリウム属に属する微生物である請求項16～20いずれかに記載の方法。

【請求項 23】 第一の微生物が、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) IFO3891、ペディオコッカス・エスピー (*Pediococcus* sp.) IFO3778 またはビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) JBF A-234-4 である請求項 16~20 いずれかに記載の方法。

【請求項 24】 第二の微生物が酵母類である請求項 16~23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】 第二の微生物が、クリベロマイセス属、ザイゴサッカロマイセス属、パフィア属よりなる群から選択される請求項 16~23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】 第二の微生物が、クリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus* var. lactis) IFO1090、クリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus* var. lactis) IFO0433、クリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus* var. marxianus) ATCC 8608、クリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus* var. bulgaricus) ATCC16045、ザイゴサッカロマイセス・ルキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) NFR2007、ザイゴサッカロマイセス・バイリー (*Zygosaccharomyces bailii*)、パフィア・ジャジニー (*Pichia jadinii*) IFO0987 よりなる群から選択される請求項 16~23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】 式 (I)

【化 1】



(I)

で表される 13-ヒドロキシー-6, 9-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid)。

【請求項 28】 請求項 7~26 のいずれかに記載の製造方法で製造される δ-ラクトン類または δ-ラクトン類を含有する組成物を食品に添加することを

特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類を含有する食品の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物による  $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸から  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を製造する方法に関する。また、本発明は、微生物による該脂肪酸から  $\delta$ -ラクトン類を製造する方法および  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ラクトン類はフルーツ香やミルク香といった好ましい香気を付与するので多くの食品中に添加され使用されている重要な化合物である。しかし、ラクトン類は天然原料中には低濃度でしか存在しないことから、一般的には化学合成品が使用されている。

【0003】

ラクトン類の微生物による生産方法としては、乳酸菌およびビフィズス菌 [ガストロエンテロロジー (Gastroenterology), 62, 430 (1972)]、コリネバクテリウム属細菌 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry), 45, 2025 (1981)]、シュードモナス属細菌 [アチーブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス (Archives of Biochemistry and Biophysics), 99, 249 (1962)] などの微生物がオレイン酸から  $\gamma$ -ドデカラクトン前駆体である 10-ヒドロキシオクタデカン酸を生成することが知られている。また、10-ヒドロキシオクタデカン酸、ひまし油中のリシノール酸などの水酸化された脂肪酸を酵母によって  $\gamma$ -ラクトン類に変換することが知られている (特開昭 60-66991 号公報、特開昭 60-100508 号公報)。

【0004】

ラクトン類を生産する酵母であるスポロボロマイセス・オドルス (Sporobolom



ycses odorus) がリノール酸から  $\delta$ -デカラクトンを生産することが知られている。13-ヒドロキシ-9, 11-オクタデセン酸 (13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid) [コリオール酸 (coriolic acid)] から  $\delta$ -デカラクトンが生産されることから、その中間体として酵母がコリオール酸を生産することが推測されている [エー・シー・エス・シンポジウム・シリーズ, フレバー・プレカーサーズ (ACS SYMPOSIUM SERIES, flavor Precursors), 490, 46, (1992)]。

【0005】

リノール酸を光酸素化あるいはダイズ・リポキシゲナーゼ処理して得られるヒドロペルオキシドを還元処理して得られるコリオール酸を前駆体にして、クラドスポリウム属細菌や酵母によって  $\delta$ -デカラクトンに変換する方法 (特開平 3-187387 号公報) は知られている。また、コリアリア・ネパレンシスの種子油に含まれるコリオール酸やメキシカン・ヤラップの根から抽出した 11-ヒドロキシパルミチン酸を前駆体にして、クラドスポリウム属細菌 [ジャーナル・オブ・オルガニック・ケミストリー (Journal of Organic Chemistry), 54, 4979 (1989)] や酵母 [ジャーナル・オブ・オルガニック・ケミストリー (Journal of Organic Chemistry), 57, 1954 (1992)、特開平 3-219886 号公報] によって  $\delta$ -デカラクトンに変換する方法は知られている。

【0006】

しかしながら、微生物によってそれぞれリノール酸と  $\alpha$ -リノレン酸から 13-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸 (13-hydroxy-9-octadecenoic acid) と 13-ヒドロキシ-9, 15-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid) を生成させそれぞれ  $\delta$ -デカラクトンとジャスミンラクトンを製造する方法は知られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、微生物により  $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の [ $n-6$ ] 位が二重結合である脂肪

酸から  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を製造する方法を提供することである。また本発明の目的は、微生物により該脂肪酸から  $\delta$ -ラクトン類を製造する方法および  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸の、 $[n-5]$  にヒドロキシを  $[n-6]$  位に水素を導入し  $[n-6]$  位を単結合とする活性を有する微生物 (以下、第一の微生物という) の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含有する組成物に作用させ、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を生成させ、生成した  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を採取することを特徴とする  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法に関する。

【0009】

また本発明は、第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含む組成物に作用させ  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸生成させ、次いで、

---

$[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を  $\beta$  酸化する活性を有する微生物 (以下、第二の微生物という) の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、生成する  $\delta$ -ラクトン類を採取することを特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類の製造方法に関する。

【0010】

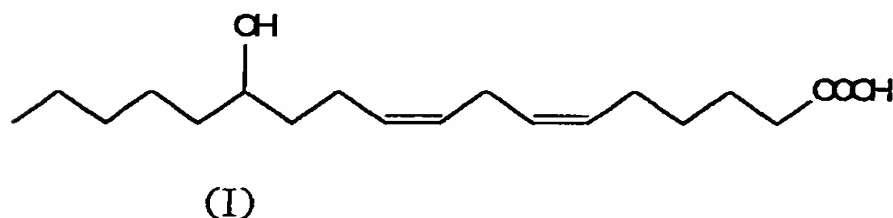
さらに本発明は、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物に、第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、該組

成物中に  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を形成させ次いで、第二の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させることを特徴とする  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を製造する方法に関する。

さらに、本発明は、式 (I)

【0011】

【化2】



【0012】

で表される 13-ヒドロキシ-6, 9-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid) に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸としては、 $[n-6]$  位が二重結合であるモノエン脂肪酸、ジエン脂肪酸、トリエン脂肪酸およびポリエン脂肪酸等があげられる。 $n$  は偶数であれば上限は特に制限はないが、10 以上 32 以下が好ましく、12 以上 26 以下がより好ましく、16 以上 22 以下が特に好ましい。

【0014】

モノエン脂肪酸としては、例えばデセン酸、ドデセン酸、テトラデセン酸、ヘキサデセン酸、オクタデセン酸、イコセン酸、ドコセン酸、テトラコセン酸、ヘキサコセン酸、オクタコセン酸、トリアコンテン酸、ドトリアコンテン酸等があげられる。

【0015】

ジエン脂肪酸としては、例えばデカジエン酸、ドデカジエン酸、テトラデカジエン酸、ヘキサデカジエン酸、オクタデカジエン酸、イコサジエン酸、ドコサジ

エン酸、テトラコサジエン酸、ヘキサコサジエン酸、テトラコサジエン酸、オクタコサジエン酸、トリアコンタジエン酸、ドトリアコンタジエン酸、テトラトリアニタアジエン酸等があげられる。

【0016】

トリエン脂肪酸としては、例えば、デカトリエン酸、ドデカトリエン酸、テトラデカトリエン酸、ヘキサデカトリエン酸、オクタデカトリエン酸、イコサトリエン酸、ドコサトリエン酸、テトラコサトリエン酸、ヘキサコサトレエン酸、オクタコサトリエン酸、トリアコンタトリエン酸、ドトリアコサトリエン酸、テトラトリアコンタトリエン酸等があげられる。二重結合としてはシス型が好ましい。

【0017】

これら脂肪酸のうち、4-デセン酸、7, 10-ヘキサデカジエン酸、リノール酸、11, 14-イコサジエン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、5, 11, 14-イコサトリエン酸、ビスホモ $\gamma$ -リノレン酸、11, 14, 17-イコサトリエン酸、6, 9, 12, 15-オクタデカテトラエン酸、7, 10, 13, 16-ドコサンテトラエン酸およびアラキドン酸が好ましく、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸および $\gamma$ -リノレン酸がより好ましく、リノール酸および $\alpha$ -リノレン酸が特に好ましい。

【0018】

本発明は、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の( $n-6$ )位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物も用いる。該組成物としては、例えば東柏油、月見草種子油、大豆油、コーン油、サフラワー油、小麦胚芽油、米油、ごま油、オリーブ油、あまに油、乳脂、牛脂、豚油、卵黄油、魚油、海草、藻類、糸状菌類、シダ類、原生動物類などがあげられる。脂肪酸がアシルグリセリンの形態で存在する場合には、リパーゼ等の加水分解酵素を用いて脂肪酸を遊離して用いることが好ましい。該加水分解酵素としては、リパーゼ等があげられ、リパーゼMY、リパーゼM10等が好ましい。

【0019】

また該組成物としては、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $(n-6)$  位が二重結合である脂肪酸を含有する食品でもよく、例えば、豆乳等があげられる。該食品としては、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $(n-6)$  位が二重結合である脂肪酸を含有しない食品に、これら脂肪酸を添加して、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $(n-6)$  位が二重結合である脂肪酸を含有する食品としてもよい。

## 【0020】

組成物および食品中の  $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $(n-6)$  位が二重結合である脂肪酸の含量は、特に制限はないが、好ましくは0.1～99.00重量%、より好ましくは1～90重量%である。

## 【0021】

本願発明で用いられる第一の微生物としては、例えば乳酸菌およびビフィズス菌に属する微生物があげられる。乳酸菌としては、例えばペディオコッカス属細菌としてペディオコッカス・ペントサセウス(*Pediococcus pentosaceus*) IFO 3891、ペディオコッカス・エスピー(*Pediococcus* sp.) IFO 3778等があげられる。ビフィドバクテリウム属細菌としては、例えばビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*) JBF A-234-4等があげられる。

## 【0022】

また本願発明で用いられる第二の微生物としては、脂肪酸を $\beta$ 酸化する活性を有する微生物で有れば、いかなる微生物でも用いうるが、例えば酵母類等があげられる。酵母類としては、例えばクリベロマイセス属、ザイゴサッカロマイセス属およびパフィア属に属する微生物等があげられる。クリベロマイセス属としては、例えばクリベロマイセス・マキシアンス(*Kluyveromyces marxianus*) IFO 1090等、ザイゴサッカロマイセス属としては、例えばザイゴサッカロマイセス・ルキシー(*Zygosaccharomyces rouxii*) NFR 2007、ザイゴサッカロマ

イセス・バイリー (*Zygosaccharomyces bailii*) 等、パフィア属としては、例えばパフィア・ジャジニー (*Pichia jadinii*) IFO0987等を例示することができる。

【0023】

これら微生物は、いずれも単独で若しくは混合して用いることができる。またこれらの微生物を人工的変異法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理、遺伝子操作などで変異させた変異株あるいは自然に変異した変異株でも、上述の活性を有する微生物であれば本発明に用いることができる。

これらの微生物の培養に用いられる培地としては、通常の酵母等の培養に用いられる培地でこれらの微生物が生育できる培地で有れば、炭素源、窒素源、無機物などを含有する合成培地、天然培地などいかなる培地も用いうる。

【0024】

炭素源としては、澱粉、デキストリン、シュクロース、グルコース、マンノース、フルクトース、ラフィノース、ラムノース、イノシトール、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜、ピルビン酸などがあげられこれらを単独又は組合せて用いることができる。使用量は1~20 g/Lが好ましい。

【0025】

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどのアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等の硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーン・スティーブ・リカー、カゼイン分解物、大豆粉、野菜ジュース、カザミノ酸、尿素、などの窒素含有有機物などがこれらを単独又は組合せて用いることができる。使用量は1~20 g/Lが好ましい。

【0026】

無機物としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などがあげられこれらを単独又は組合せて用いることができる。使用量は0.1~2 g/Lが好ま

しい。

#### 【0027】

微量成分としては、ビオチン、サイアミン又はニコチン酸などのビタミン類やβ-アラニン又はグルタミン酸などのアミノ酸類などがあげられこれらを単独又は組合せて用いることができる。使用量は0.0001～2g/Lが好ましい。

培養法としては、液体培養法、特に深部攪拌培養法が好ましい。培養は温度10～80℃、好ましくは10～60℃、特に好ましくは20～40℃、培養液のpHは2～11、好ましくはpH3～10、特に好ましくはpH5～8で行われ、通常1～7日間培養する。培地のpH調整にはアンモニア水や炭酸アンモニウム溶液などが用いられる。

#### 【0028】

本発明に用いる培養液の処理物としては、n（nは10以上の偶数）個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の[n-6]位が二重結合である脂肪酸の、[n-5]にヒドロキシを[n-6]位に水素を導入し[n-6]位を単結合とする活性を有する微生物の培養液の濃縮物、乾燥物、冷凍物、冷蔵物、凍結乾燥物、加熱物、加圧物、超音波破碎物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物などがあげられる。

#### 【0029】

また、菌体処理物としては、n（nは10以上の偶数）個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の[n-6]位が二重結合である脂肪酸の、[n-5]にヒドロキシを[n-6]位に水素を導入し[n-6]位を単結合とする活性を有する微生物の菌体の乾燥物、冷凍物、冷蔵物、凍結乾燥物、加熱物、加圧物、超音波破碎物、界面活性剤又は有機溶剤処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体あるいは菌体から抽出した酵素などがあげられる。

#### 【0030】

菌体からの酵素の精製には、タンパク質の一般的な精製法を用いることができる。例えば、ホモジナイザー、ガラスビーズ、アンモニア溶解、酵素法などによる菌体の破碎、ろ過、遠心分離などによる酵素液の回収、塩析、有機溶媒沈殿、抗体などによる酵素の回収、透析などによる濃縮、限外ろ過、ゲルろ過、電気泳

動法、液相分配法による分離、イオン交換体、吸着剤、アフィニティー吸着体などを用いたクロマトグラフィー、バッチ法、結晶化などを単独であるいは組合せて用いることができる。

#### 【0031】

次に、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法および  $\delta$ -ラクトン類の製造方法について述べる。

第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含む組成物に作用させ、生成する  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を採取することにより、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を製造することができる。具体的に以下の様にして製造することができる。

#### 【0032】

該微生物の培養液、菌体もしくはそれらの処理物および  $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含む組成物を必要に応じて水等の水性媒体に加え 10～80℃、好ましくは 20～40℃、 $pH$  2～11、好ましくは  $pH$  3～10、より好ましくは  $pH$  5～8 の条件下、6 時間～7 日間、より好ましくは 1～4 日間反応を行う。

#### 【0033】

反応液には必要に応じてさらに緩衝液、界面活性剤、有機溶剤、抗酸化剤等を添加することができる。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、クエン酸緩衝液等をあげることができる。緩衝液の濃度は 0.01～1 mol/L が好ましい。界面活性剤としては、例えばショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル等をあげることができる。界面活性剤の濃度としては、0.1～5% が好ましい。有機溶剤としては、エタノール等をあげることができる。有機溶剤の濃度としては、1～50 g/L が好ましい。抗酸化剤としては、食品蛋白質など食品で利用可能な抗酸化剤があげられ、例えば  $\alpha$ -トコフェロール、ビタミン E、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ジブチルヒドロ



キシトルエン (BHT)、脱脂粉乳等があげられる。抗酸化剤の濃度としては、 $0.01 \sim 50 \text{ g/L}$ が好ましい。

#### 【0034】

とくに、微生物の菌体を用いるときは、第一の微生物を炭素源、窒素源等を含むする  $5 \sim 50 \text{ mL}$  の培地に  $1 \sim 3$  白金耳植菌し、 $1 \sim 5$  日間静置培養して得られる種培養液を、 $n$  ( $n$  は  $10$  以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含有する組成物に  $0.1 \sim 5\%$  植菌して静置または低速で攪拌培養を行う。培養温度は、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸に変換可能な温度であれば、第一の微生物は増殖してもしなくてもよく、好ましくは、 $5 \sim 40^\circ\text{C}$  である。培養時間は条件により異なるが、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸が最大量に生成される時間まで培養すればよく、通常  $1 \sim 4$  日間程度である。

#### 【0035】

反応液中の  $n$  ( $n$  は  $10$  以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸から変換される  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の抽出および検出方法は、通常の脂質混合物抽出方法および薄層クロマトグラフィー (TLC) による脂質混合物検出方法を用いることができる。すなわち、約  $0.2 \sim 10 \text{ mL}$  の反応液に約  $30 \sim 80$  重量%のクロロホルム/メタノール ( $2:1$ ,  $v/v$ ) などの混合溶媒を添加して  $10$  分間振とう後、遠心分離を行って下層液を分取することによって脂質混合物が抽出される。続いて、その脂質抽出液  $1 \sim 20 \mu\text{l}$  をシリカゲルプレコート TLC プレートにスポットして適当な溶媒系を用いて展開後、適当な発色剤により発色させその発色を検知することで、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を検出することができる。TLC プレートには TLC ガラスプレート 60 (No. 5721、メルク社製) 等を用いることができる。

#### 【0036】

$[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を培養液から単離精製

するには、脂質混合物を単離する通常の方法が適用される。すなわち、ジエチルエーテル／トルエン（15：85～60：40，v／v）などの混合溶媒による脂質抽出、ろ過、遠心分離などによる菌体除去、吸着樹脂、シリカゲル、逆相シリカゲル、酸化アルミニウム、セルロース、ケイ藻土、ケイ酸マグネシウム、ゲル濾過剤、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィーによる脂質混合物の吸脱着処理もしくは、適当な溶媒系による分配などによって、約90～100％純度の〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸が単離精製される。単離された〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸は上述の薄層クロマトグラフィー法により検出することができる。また、単離された〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸は例えば以下の条件で高速液体クロマトグラフィーにより定量することができる。

## 【0037】

装置：SPD-10A（島津製作所製）

カラム：TSK-gel ODS-80Ts（東ソー製）、

移動相：A液：アセトニトリル／水／酢酸

（28：72：0.02，v／v／v）

B液：アセトニトリル／水／酢酸

（52：48：0.02，v／v／v）

A液（10分）、A液→B液（60分 直線濃度勾配）、B液（30分）

流量：2ml／分、温度：40℃、検出：UV-200nm

## 【0038】

〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸は、食品添加物等として有用なδ-ラクトン類の製造に用いることができる。

## 【0039】

以下に、〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸からδ-ラクトン類を製造する方法について述べる。

上述の方法により製造される〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液、該反応液処理物または該反応液から単離した〔n-6〕

〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸に、第二の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を添加し、必要に応じて水等の水性媒体に加え、10～80℃、好ましくは20～50℃、pH2～9、好ましくはpH3～8、より好ましくはpH4～7の条件下で12時間～7日間、より好ましくは1～4日間、特に好ましくは2～3日間反応を行う。〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液処理物とは、〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液を単離精製過程で得られる〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸を含有する処理物をいう。

【0040】

反応液には必要に応じてさらに前述の緩衝液、界面活性剤、有機溶剤、抗酸化剤等を添加することができる。

とくに、微生物の菌体を用いるときは、酵母等の第二の微生物を炭素源、窒素源等を含有する5～50mLの培地に1～3白金耳植菌し、1～5日間静置培養して得られる種培養液、または100mL～1Lの培地に該種培養液を1～5%植菌して1～5日間静置培養して得られる種培養液を、〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液に0.1～50%植菌して通気攪拌を行い、好氣的条件下で培養を行う。通気攪拌は $\delta$ -ラクトン類が最大量に生成される条件であればよく、好ましくは、通気は0.01～3vvm、攪拌は200～1200rpmである。培養温度は、〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸を $\delta$ -ラクトン類に変換可能な温度であれば微生物が成育しない温度でもよく、好ましくは、5～35℃である。培養時間は条件により異なるが、 $\delta$ -ラクトン類が最大量に生成される時間まで培養すればよく、通常12時間～7日間である。

【0041】

本発明によって得られる $\delta$ -ラクトン類を含有する反応液は、そのままあるいは必要により殺菌した後、食品等に添加することもできる。また、 $\delta$ -ラクトン類を精製した後、食品等に添加することができる。添加される食品としては乳飲料、乳加工品、畜産加工品、洋菓子、アイスクリーム、スナック等の菓子類、ホワイトソース、チーズソース、ドレッシング等の調味料類などがあげられるが、

これらの食品に限定されるものではない。その配合量は喫食品において $\delta$ -ラク  
トン類の濃度にして約0.1~100ppm、好ましくは約0.25~20ppm  
の範囲で使用される。

【0042】

上述の反応液中に生成した $\delta$ -ラクトン類を単離精製するには、通常の溶媒抽  
出法等を用いることができる。すなわち、約0.2~10mlの反応液または培  
養液に約20~60重量%のペンタン/エーテル混合溶媒(5:95~80:2  
0, v/v)と20~60重量%の飽和食塩水を添加して10分間振とう後、遠  
心分離を行って上清液を分取することによって $\delta$ -ラクトン類を単離精製するこ  
とができる。

【0043】

$\delta$ -ラクトン類の分析、定量方法は例えば以下の条件でガスクロマトグラフィ  
ーにより行うことができる。

装置：ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP5000(島津製作所製  
)

カラム：TC-WAX 60m 0.25mm $\times$ 0.25 $\mu$ m、

ヘリウム流量：0.5ml/分、

カラム温度：40 $^{\circ}$ C(0.5分)-5 $^{\circ}$ C/分-240 $^{\circ}$ C(69.5分)

圧力：50Kpa(0分)-5Kpa/分-300Kpa(60分)

$\delta$ -ラクトン類標準標品： $\delta$ -デカラクトン(アルドリッチ社製)、ジャスミ  
ンラクトン(日本ゼオン社製)

---

以下に、本発明の実施例、比較例および試験例を示す。

【0044】

【実施例】

以下の実施例において、FABマススペクトル測定および高分解能FABマス  
スペクトル測定は、JMS-HX/HX110A(日本電子社製)を、NMR測  
定はJNM-A400(日本電子社製)を用いて常法に従い行った。

【0045】

実施例1 ヒドロキシ脂肪酸の生成

下表に示す脂肪酸（シグマ社製）を各々 0.5 g ずつ 100 ml の栄養培地（酵母エキス 0.18 g、ポリペプトン 0.42 g、60% 液体グルコース 0.62 ml、pH 6.5）に添加し、抗酸化剤としてイーミックス 80（エーザイ製）を 0.02 ml、また分散剤として脱脂粉乳を 2 g 添加して、ペディオコッカス・ペントサセウス（Pediococcus pentosaceus）IFO 3891 の種培養液を 3 ml 植菌し、25℃で2日間、80 rpm で攪拌培養した。

## 【0046】

各々の培養液 0.5 ml から、等量のクロロホルム／メタノール（2：1，v／v）溶媒を用いて脂質混合物を抽出し、TLC ガラスプレート・シリカゲル 60（メルク社製 No. 5721）に各 5  $\mu$ l スポットした。第1段回目の展開はトルエン／ジエチルエーテル／エタノール／酢酸（50：40：2：0.2，v／v／v／v）を用いて20分間行った後にプレートを乾燥させた。続いて第2段回目の展開溶媒としてヘキサン／ジエチルエーテル（94：6，v／v）を用いて35分間展開後プレートを乾燥させ、発色剤として 6 g／100 ml 酢酸銅を含む 8%（w／w）りん酸溶液を適量展開面に噴霧し、140℃で25分間加熱した。

## 【0047】

この結果を第1表に示す。いずれの脂肪酸を用いた場合も、 $R_f = 0.13 \sim 0.22$  の位置に褐色のスポットが検出され、脂肪酸から変換されたヒドロキシ脂肪酸が、期待された位置に褐色のスポットとして検出された。

## 【0048】

【表 1】

第 1 表

脂肪酸	Rf 値
リノール酸(Linoleic acid)	0.19
$\gamma$ -リノレン酸( $\gamma$ -Linolenic acid)	0.17
$\alpha$ -リノレン酸( $\alpha$ -Linolenic acid)	0.16
シス-11, シス-14-エイコサジエン酸 (cis-11, cis-14-Eicosadienoic acid)	0.18
シス-8, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸 (cis-8, cis-11, cis-14-Eicosatrienoic acid)	0.18
シス-11, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸 (cis-11, cis-14, cis-17-Eicosatrienoic acid)	0.18
シス-13, シス-16-ドコサジエン酸 (cis-13, cis-16-Docosadienoic acid)	0.20

【0049】

## 実施例 2 リノール酸の水酸化物の製造

リノール酸 5 g を 1000 ml の栄養培地（酵母エキス 1.8 g、ポリペプトン 4.2 g、60% 液体グルコース 6.2 ml を含む、pH 6.5）に添加し、抗酸化剤としてイーミックス 80（エーザイ社製）を 0.2 ml、また分散剤として脱脂粉乳を 20 g 添加して、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) IFO 3891 の種培養液を 30 ml 植菌し、25℃で2日間、80 rpm で攪拌培養した。

【0050】

得られた約 1000 ml の培養液に約 120 重量%のジエチルエーテル／トルエン（4：5，v/v）混合溶媒を添加して約 20 分間振とう後、遠心分離を行って上清を分取することによって脂質混合物を抽出した。続いてロータリーエバポレーターで約 50 ml に濃縮し、カラムクロマトグラフィーを用いてヒドロキシ脂肪酸の分離を行なった。すなわち、約 80 g のシリカゲル（Wako gel C-2000）を内径 3.14 cm×50 cm のガラス管に入れ上記の混合溶媒 300 ml で洗った。これに脂質混合物試料を添加した後、上記の混合溶媒 500 ml を 3 ml/分の速度で流し、5 ml ずつの画分に分けて溶出を行った

。各溶出画分の脂質をシリカゲルプレコート TLC プレートを用いて、ヒドロキシ脂肪酸画分を検出することにより 13-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸 (13-hydroxy-9-octadecenoic acid) を得た。

【0051】

13-hydroxy-9-octadecenoic acid の理化学的性質

- (1) 分子式:  $C_{18}H_{34}O_3$
- (2) FAB マススペクトル:  $m/z$  299  $(M+H)^+$
- (3) 高分解能 FAB マススペクトル:  $m/z$  299.2592  $(M+H)^+$ ,  $C_{18}H_{35}O_3$  としての計算値 = 299.2586
- (4)  $^{13}C$ -NMR スペクトル (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度), 179.2(s), 130.5(d), 129.3(d), 71.9(d), 37.4(t), 37.3(t), 34.0(t), 31.9(t), 29.7(t), 28.9(t), 28.9(t), 28.9(t), 27.1(t), 25.3(t), 24.7(t), 23.6(t), 22.6(t), 14.0(q)

【0052】

- (5)  $^1H$ -NMR スペクトル (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数  $J$  (Hz)), 5.38(1H,m), 5.38(1H,m), 3.63(1H,m), 2.33(2H,t,7.4), 2.12(2H,m), 2.04(2H,q,6.5), 1.63(2H,m), 1.52(2H,m), 1.52(2H,m), 1.44(2H,m), 1.31(2H,m), 1.31(2H,m), 1.31(2H,m), 1.31(2H,m), 1.31(2H,m), 0.89(3H,t,6.8)

【0053】

実施例 3  $\alpha$ -リノレン酸の水酸化物 (13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid) の製造

リノール酸を  $\alpha$ -リノレン酸に代える以外は実施例 2 と同様に行い 13-ヒドロキシ-9, 15-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid) を得た。

【0054】

13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid の理化学的性質

- (1) 分子式:  $C_{18}H_{32}O_3$
- (2) FAB マススペクトル:  $m/z$  297  $(M+H)^+$

(3) 高分解能FABマススペクトル:  $m/z$  297.2421( $M+H$ )<sup>+</sup>,  $C_{18}H_{33}O_3$ としての計算値=297.2430

(4)  $^{13}C$ -NMRスペクトル (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度), 178.3(s), 135.2(d), 130.6(d), 129.2(d), 124.4(d), 71.3(d), 36.7(t), 35.3(t), 33.9(t), 29.5(t), 28.9(t), 28.9(t), 28.9(t), 27.1(t), 24.7(t), 23.7(t), 20.7(t), 14.3(q)

【0055】

(5)  $^1H$ -NMRスペクトル (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数J(Hz)), 5.56(1H,m), 5.38(1H,m), 5.37(1H,m), 5.37(1H,m), 3.65(1H,m), 2.34(2H,t,7.4), 2.23(2H,t,7.1), 2.15(2H,m), 2.07(2H,m), 2.03(2H,m), 1.64(2H,m,7.1), 1.54(2H,m), 1.32(2H,m), 1.32(2H,m), 1.32(2H,m), 1.32(2H,m), 0.97(3H,t,7.4)

【0056】

実施例4  $\gamma$ -リノレン酸の水酸化物 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid) の製造

リノール酸を $\gamma$ -リノレン酸に代える以外は実施例2と同様に行い13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid) を得た。

【0057】

13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acidの理化学的性質

(1) 分子式:  $C_{18}H_{32}O_3$

(2) FABマススペクトル:  $m/z$  297 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

(3) 高分解能FABマススペクトル:  $m/z$  297.2426( $M+H$ )<sup>+</sup>,  $C_{18}H_{33}O_3$ としての計算値=297.2430

(4)  $^{13}C$ -NMRスペクトル (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度), 178.6(s), 129.6(d), 129.4(d), 128.4(d), 128.4(d), 71.8(d), 37.4(t), 37.1(t), 33.9(t), 31.9(t), 28.9(t), 26.8(t), 25.6(t), 25.3(t), 24.4(t), 23.6(t), 22.6(t), 14.0(q)

【0058】



(5)  $^1\text{H}$ -NMRスペクトル (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数J(Hz)), 5.38(1H,m), 5.38(1H,m), 5.38(1H,m), 5.38(1H,m), 3.64(2H,m), 2.80(2H,t,5.6), 2.35(2H,t,7.3), 2.18(2H,m), 2.09(2H,q,7.5), 1.67(2H,m), 1.55(2H,m), 1.45(2H,m), 1.45(2H,m), 1.42(2H,m), 1.31(2H,m), 1.31(2H,m), 0.89(3H,t,6.8)

## 【0059】

## 実施例 5

100mlの栄養培地(酵母エキス0.18g、ポリペプトン0.42g、60%液体グルコース0.62ml、pH6.5)にリノール酸(シグマ製社)0.5gを添加し、抗酸化剤としてイーミックス80(エーザイ社製)を0.02ml、また分散剤として脱脂粉乳を2g添加して、第一の微生物としてペディオコッカス・ペントサセウス(*Pediococcus pentosaceus*) IFO3891の種培養液を3ml植菌し、25℃で2日間、80rpmで攪拌培養した。

## 【0060】

得られた培養液0.5mlから、等量のクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)溶媒を用いて脂質混合物を抽出し、TLCガラスプレート・シリカゲル60(No. 5721、メルク社製)に5 $\mu$ lスポットした。第1段回目の展開はトルエン/ジエチルエーテル/エタノール/酢酸(50:40:2:0.2, v/v/v/v)を展開溶媒として20分間行った後プレートを乾燥させ、続いて第2段回目の展開溶媒としてヘキサン/ジエチルエーテル(94:6, v/v)を用いて35分間展開後プレートを乾燥させた。発色剤として6g/100ml 1酢酸銅を含む8%(w/w)りん酸溶液を適量展開面に噴霧し、140℃で25分間加熱した。

## 【0061】

リノール酸から変換されたヒドロキシ脂肪酸のスポット(Rf=0.19)が褐色に着色して検出された。

## 【0062】

## 実施例 6

100mlの栄養培地(酵母エキス0.18g、ポリペプトン0.42g、6

0%液体グルコース0.62ml、pH6.5)に $\alpha$ -リノレン酸(シグマ社製)0.5gを添加し、抗酸化剤としてイーミックス80(エーザイ社製)を0.02ml、また分散剤として脱脂粉乳を2g添加して、第一の微生物としてペディオコッカス・ペントサセウス(*Pediococcus pentosaceus*)IFO3891の種培養液を3ml植菌し、25℃で2日間80rpmで攪拌培養した。

## 【0063】

得られた培養液を実施例1と同様に脂質混合物抽出及びTLCを行い $\alpha$ -リノレン酸から変換されたヒドロキシ脂肪酸の検出を行った。その結果ヒドロキシ脂肪酸のスポット(Rf=0.16)が褐色に着色して検出された。

## 【0064】

## 実施例7

100mlの栄養培地(酵母エキス0.18g、ポリペプトン0.42g、60%液体グルコース0.62ml、pH6.5)に $\gamma$ -リノレン酸(シグマ社製)0.5gを添加し、抗酸化剤としてイーミックス80(エーザイ社製)を0.02ml、また分散剤として脱脂粉乳を2g添加して、第一の微生物としてペディオコッカス・ペントサセウス(*Pediococcus pentosaceus*)IFO3891の種培養液を3ml植菌し、25℃で2日間攪拌培養(80rpm)した。

## 【0065】

実施例1の脂質混合物抽出法とTLC法により $\gamma$ -リノレン酸から変換されたヒドロキシ脂肪酸の検出を行った。その結果、ヒドロキシ脂肪酸のスポット(Rf=0.17)が褐色に着色して検出された。

## 【0066】

## 実施例8

930mlの水にコーン油(味の素社製)を40ml添加し、抗酸化剤としてイーミックス80(エーザイ社製)を0.2ml、加水分解酵素リパーゼMY(名糖産業社製)を0.4g添加して40℃で24時間加水分解処理をした。得られた加水分解コーン油に、脱脂粉乳20g、酵母エキス1.8g、ポリペプトン4.2g、60%液体グルコース6.2mlを添加し、pHを6.5に調整し、ペディオコッカス・ペントサセウス(*Pediococcus pentosaceus*)IFO3891

の種培養液を 30 ml 植菌し、25℃で2日間400 rpm 攪拌培養した。得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス(Kluyveromyces marxianus) IFO 1090 の種培養液を 30 ml 植菌し、25℃で4日間900 rpm、1 v v m で通気攪拌培養を行なった。その結果、培養物中に 392 ppm の  $\delta$ -デカラクトンを得た。

【0067】

## 実施例 9

実施例 8 と同様にして調製された加水分解コーン油を含有する培地に、ペディオコッカス・エスピー(Pediococcus sp.) IFO 3778 の種培養液を 30 ml 植菌し、25℃で2日間400 rpm で攪拌培養した。得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス(Kluyveromyces marxianus) IFO 1090 の種培養液を 30 ml 植菌し、25℃で4日間900 rpm、1 v v m で通気攪拌培養を行なった。その結果、培養物中に 173 ppm の  $\delta$ -デカラクトンを得た。

【0068】

## 実施例 10

実施例 8 と同様にして調製された加水分解コーン油を含有する培地に、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(Bifidobacterium bifidum) JBF A-234-4 の種培養液を 30 ml 植菌し、25℃で2日間400 rpm で攪拌培養した。得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス(Kluyveromyces marxianus) IFO 1090 の種培養液を 30 ml 植菌し、25℃で4日間900 rpm、1 v v m で通気攪拌培養を行なった。その結果、培養物中に 115 ppm の  $\delta$ -デカラクトンを得た。

【0069】

## 実施例 11

465 ml の水にコーン油(味の素社製)を 20 ml 添加し、抗酸化剤としてイーミックス 80 (エーザイ社製)を 0.1 ml、加水分解酵素リパーゼ MY (名糖産業社製)を 0.2 g 添加して 40℃で 24 時間加水分解処理をした。得られた加水分解コーン油に、脱脂粉乳を 10 g、酵母エキス 0.9 g、ポリペプトン 2.1 g、60% 液体グルコース 3.1 ml を添加し、pH を 6.5 に調整し

、ペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus) IFO3891の種培養液を15ml植菌し、25℃で2日間400rpmで攪拌培養した。得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス (Kluyveromyces marxianus) IFO1090の栄養培地で2日間培養した種培養液を500ml混合し、25℃で2日間900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。その結果、培養物中に502ppmの $\delta$ -デカラクトンを得た。

【0070】

#### 実施例 12

実施例8で得られた培養物を85℃、1分間の殺菌処理した後、市販のコーンクリームスープ200gに0.6ml添加した。このスープ中の $\delta$ -デカラクトンの濃度は1.18ppmであり、 $\delta$ -デカラクトンを含有させた結果、まろやかなミルク感のあるコーンクリームスープとなった。

【0071】

#### 実施例 13

実施例8で得られた培養物を85℃、1分間の殺菌処理した後、市販の低脂肪乳200mlに0.3ml添加した。低脂肪乳中の $\delta$ -デカラクトン濃度は0.59ppmであり、 $\delta$ -デカラクトンを含有させた結果、粉乳臭がマスキングされ、ミルク香の改善された低脂肪乳となった。

【0072】

#### 実施例 14

豆乳500mlに乳酸菌としてペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus) IFO3891を15ml植菌し、25℃で1日間静置培養した。得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス (Kluyveromyces marxianus) IFO1090を15ml植菌し、25℃で2日間900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

【0073】

その結果、培養物中に2.7ppmの $\delta$ -デカラクトンを得た。得られた培養物は青臭がマスキングされ、風味の改善された発酵豆乳であった。

【0074】

## 【発明の効果】

本発明により、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸から  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法が提供される。また、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸から  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を経て  $\delta$ -ラクトン類を製造する方法が提供される。さらに、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物から  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を製造する方法が提供される。

## 【0075】

本発明によれば、微生物の菌体、培養液またはそれら処理物により低価格な食品原料に由来するリノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸および $\gamma$ -リノレン酸等の脂肪酸から工業的に有用な  $\delta$ -ラクトン類を大量かつ容易に製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 食品添加物等に有効な $\delta$ -ラクトン類の製造方法を提供する。

【解決手段】  $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$ 位が二重結合である脂肪酸の、 $[n-5]$ 位にヒドロキシを $[n-6]$ 位に水素を導入し $[n-6]$ 位を単結合とする活性を有する微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$ 位が二重結合ある脂肪酸若しくは該脂肪酸を含む組成物に作用させ $[n-6]$ 位が単結合の $[n-5]$ -ヒドロキシ脂肪酸生成させ、次いで、 $[n-6]$ 位が単結合の $[n-5]$ -ヒドロキシ脂肪酸を $\beta$ 酸化する活性を有する微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、生成する $\delta$ -ラクトン類を採取する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社

